

Állatorvostudományi Egyetem

Belgyógyászati Tanszék és Klinika

**Egészséges kutyák szérum hepcidin szintjének vizsgálata
LC/MS módszerrel**

Készítette: Bagi Melinda

Témavezetők:

Dr. Vizi Zsuzsanna
klinikai állatorvos, osztályvezető
ÁTE Belgyógyászati Tanszék és Klinika

Dr. Sterczer Ágnes
egyetemi docens
ÁTE Belgyógyászati Tanszék és Klinika

Budapest, 2018

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
2. BEVEZETÉS	4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
3.1. A hepcidin felfedezése és jelentősége	5
3.2. A vas szerepe a szervezetben	6
3.3. A hepcidin tulajdonságai.....	8
3.3.1. A hepcidin formái és szerkezete.....	8
3.3.2. A hepcidin termelődése és szerepe.....	8
3.3.3. A hepcidin klinikai vonatkozása	10
3.4. A humán hepcidin kutatások	11
3.5. A hepcidin vizsgálata kutyákban.....	12
3.5.1. Szekvenciája és referencia értéktartománya.....	12
3.5.2. A humán kutatások eredményeinek hatása az állatorvostudományra	14
3.5.3. Az egészséges kutyák kiszűrése a vizsgálathoz	14
4. CÉLKITŰZÉSEK	15
5. ANYAG ÉS MÓDSZER	16
5.1. A mintavétel menete és a laboratóriumi vizsgálat.....	16
5.2. A hepcidin mennyiségi mérése LC/MS módszerrel.....	19
5.3. Statisztikai analízis	20
6. EREDMÉNYEK	21
6.1. A vizsgált minták jellemzői.....	21
6.2. A hepcidin referencia értéktartománya és korrelációi.....	21
7. MEGBESZÉLÉS	24
8. ÖSSZEFOGLALÓ	26
9. SUMMARY	27
10. IRODALOMJEGYZÉK	28
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	30

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AID	anaemia of inflammatory disease
ALT	alanin amino-transzferáz
CD	cirkuláris dikroizmus spektroszkópia
cDNS	komplementer DNS
CHr	reticulocytá haemoglobin content
CRP	C-reaktív protein
DCYTB	duodenal cytochrome b
DMT1	divalent metal transporter 1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HCP-1	heme carrier protein 1
hepcidin	hepatic bactericid protein
HFE	a hemokromatózis gén fehérje
HO	hem oxigenáz
IL-6	interleukin-6
LC/MS	liquid chromatography – mass spectrometry
LEAP-1	liver-expressed antimicrobial peptide 1
LPS	lipopoliszacharid
LVK	látens vaskötő kapacitás
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight tömegspektrometria
MCH	mean cellular hemoglobin
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	mean cellular volume
mRNS	messenger RNS

RDW	reticulocyte distribution width
rMCV	mean reticulocyte volume
RP-HPLC	reversed phase high-performance liquid chromatography
SELDI-TOF	surface-enhanced laser desorption ionization - time of flight tömegspektrometria
TVK	teljes vaskötő kapacitás
USF2	upstream stimulating factor 2
WBC	white blood cell

2. BEVEZETÉS

A hepcidin (**hepatic bactericid protein**) a szervezet vas anyagforgalmát befolyásoló hormon, amelynek kutatása a 2000-es évek elején kezdődött. A fehérje szerepének vizsgálata során bebizonyosodott, hogy antimikrobiális tulajdonsággal bír és a szervezet vasháztartásának szabályozásában kiemelt jelentősége van. A vas elengedhetetlen mikroeleme a szervezetnek, ezért fontos az olyan fehérjék vizsgálata, amelyek képesek befolyásolni a vas homeosztázist. A hepcidin antimikrobiális tulajdonságának alapja, hogy a ferroportin expresszió szabályozásával elzárja a vasat a mikroorganizmusoktól, ezáltal segítve azok eliminációját a szervezetből. Ennek következménye azonban, hogy a szervezet normál vörösvérsejtképzéséhez is alacsony mennyiségű vas áll rendelkezésre, ami különböző nemregeneratív anaemiás kórképek kialakulásához vezet.

Fontos elkülöníteni a különböző anaemiák hátterében álló gyulladással eredetű betegségeket az egyéb vérséjtképzési zavaroktól. Amennyiben a hepcidin mérése bekerülne a diagnosztikai eljárások közé, egyszerűsödne a differenciál diagnózisok felállítása.

Elsőként a humán orvostudomány kutatói állapították meg az egészséges emberek hepcidin referencia értéktartományát és vetették össze a beteg emberek értékeivel. A vizsgálati eredmények igazolták, hogy a különböző gyulladással betegségek esetén emelkedett hepcidin szint mérhető. Ennek az összefüggésnek a kimutatása és bizonyítása indította el a különböző állatfajok hepcidin koncentrációjának vizsgálatát. Az elvégzett kutatások több állatfaj hepcidin szekvenciáját is feltérképezték.

A kutatásom célja a szérumban hepcidin szint referenciaértékének meghatározása egészséges kutyákban, amelyet tudomásunk szerint eddig még nem sikerült megállapítani. Korábban voltak előzetes vizsgálatok az Állatorvostudományi Egyetemen arra vonatkozóan, hogy egészséges és beteg kutyákban is megmérjék a hepcidin szintet, a mérési módszerek azonban továbbfejlesztésre szorultak.

A referenciaérték meghatározása lehetőséget adna arra, hogy összevessük a beteg kutyákban mérhető szinttel és ezzel alátámaszunk a humán területen felállított hipotézist. Továbbá a jövőben gyakorlati szerepet kaphatna a hepcidin szint mérése a hétköznapi állatorvoslásban is, hozzájárulva a minél gyorsabb és pontosabb diagnosztikai kórkép felállításához.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A hepcidin felfedezése és jelentősége

A hepcidin genetikai szerkezete sokáig nem volt tisztázott, mivel a rendelkezésre álló módszerek nem tették még lehetővé egy ilyen kisméretű gén kimutatását (1). Park és mtsai 2000-ben humán vizeletből izoláltak egy cisztinben gazdag peptidet. A hepcidin nevet kapta, amely a májbeli képződéséből (**hepatic**), az antimikrobiális hatásából (**bactericid**) és fehérje (**protein**) tulajdonságából ered. A hepcidin mRNS főleg májban lévő prekuzort kódol, de a peptid első felfedezése humán vizeletből történt. A vizeletből való kimutatáshoz kation cserélő kromatográfiát, RP-HPLC-t (reversed phase high-performance liquid chromatography) és CD spektroszkópiát (cirkuláris dikroizmus spektroszkópia) használtak (2). Szintén 2000-ben Krause és mtsai humán vérből mutatták ki az antimikrobiális hatású peptidet, amit LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide 1) néven írtak le (3).

A hepcidin további vizsgálata során sikerült összehasonlítani az egerek és az emberek hepcidinjét, továbbá felderíteni a hepcidin és a szervezet vasháztartása közötti összefüggést. Az egerek egy csoportjában kísérletesen vastúlterhelést idéztek elő (vas-karbonil és vas-dextrán felhasználásával), a másik csoport állataiban spontán vastúlterhelést alakítottak ki (β 2-mikroglobulin knockout egerek), míg a harmadik csoportban lévő egerek kontrollként szolgáltak. A kísérlet kimutatta, hogy egy máj specifikus mRNS nagymértékű expresszáldását váltja ki a máj vastúlterhelése. Az izolált cDNS által kódolt 83 aminosavból álló fehérje C-terminális régiója pedig szoros hasonlóságot mutat a humán hepcidin fehérjével. Az egér és humán *HEPC* gén is a 7. és 19. kromoszómán található közvetlenül az *USF2* gén mellett (4). *USF2* knockout egerekben fokozatosan multivisceralis vastúlterhelést előidézve jelentős vas felhalmozódás alakult ki a májban és a hasnyálmirigyben. A szervi elváltozások hasonlóak voltak az öröklődő hemochromatosis okozta betegséghez, így vizsgálták a vas státuszát az egerekben. A vas metabolizmus változásában tapasztalható hasonlóságok a *HFE* knockout egerek és az *USF2*^{-/-} hepcidin hiányos egerek között arra utal, hogy a hepcidin ugyanazon a szabályozási úton működik, mint a HFE-fehérje. A kutatás során továbbá vizsgálták a hepcidin hatását a makrofágok vastárolására. Megállapították, hogy a mutálódott HFE fehérje vagy a hepcidin expresszió teljes hiánya emelkedett bélbeli vas abszorpciót és a makrofágokban csökkent vastárolást eredményezhet. A kutatás kiemelt eredménye a hepcidin kulcsszerepének bizonyítása volt a vas homeosztázisban. Amennyiben a hepcidin

génje mutálódik, feltételezhető, hogy az abnormális vas metabolizmus, illetve az öröklődő hemochromatosis betegség gyakorisága emelkedik (5).

3.2. A vas szerepe a szervezetben

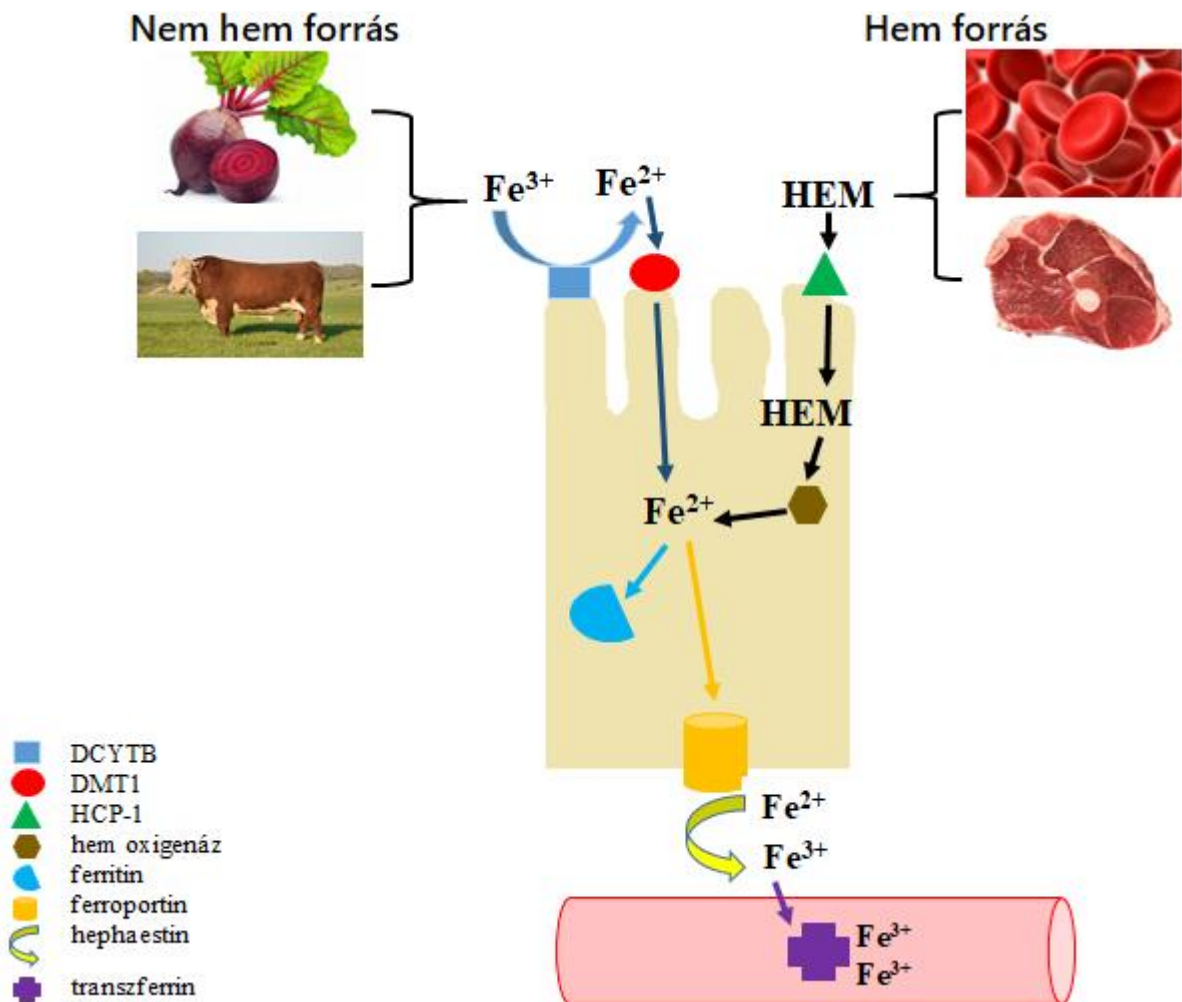
A hepcidin fontos szerepet játszik a szervezet vas anyagforgalmában. A vasforgalom szabályozása azért fontos a szervezet számára, mert a vas számos élettani folyamat része. Ez az elem segít az oxigénszállításban, az energiatermelésben és számos enzimreakcióban. A nem megfelelő szabályozása azonban toxikus következményekkel járhat. A szabad vas különböző reakciókban vehet részt, így oxigén szabadgyökök képződnek, amelyek számos biológiai molekulát károsíthatnak (6, 7).

A vas vitathatatlanul minden élő szervezet számára elengedhetetlen mikroelem. A vastartalmú táplálék az egyetlen vas forrása a szervezetnek (8). A különböző táplálékokban a vas főként hem és nem hem (vagy szervetlen) formában található meg. A hem forma főleg a hemoglobinnal és a húsvér myoglobinnal származik. A nem hem (nagyértékben Fe^{3+}) eredetű vas megtalálható a húsfélékben és a növényekben is. Ez a forma oldhatatlan, és a hemmel szemben a biológiai hasznosíthatóságát számos táplálkozási összetevő befolyásolhatja. Bár a táplálékban lévő vas leginkább Fe^{3+} formájában található meg, az enterocytákba való bejutáshoz az Fe^{2+} redukált forma szükséges. Ennek következtében a ferri formát először redukálnia kell a szervezetnek az enterocytákba történő transzport előtt (6). Ezt a feladatot a duodenum enterocytáiban expresszálandó DCYTB (duodenal cytochrome b) látja el, amely egy vas regulált Fe^{3+} reduktáz (9).

A Fe^{2+} a DMT1 (divalent metal transporter 1) transzporterrel keresztül jut be a bélhámsejt apicális oldalán. A vas hem kötött formában is felszívódhat a HCP-1 (heme carrier protein 1) transzporter segítségével. A hem gyorsan katabolizálódik a hem oxigenáz (HO) révén, és vas szabadul fel (8). Az enterocytákba került vas az endogén ferritin által raktározódik vagy exportálódik a vérbe, hogy eljusson a különböző szövetekhez. A sejt basolateralis oldalán található ferroportin az egyetlen emlősökben ismert transzporter fehérje, amely a vas exportjáért, vagyis az enterocytákból a vérbe történő jutásáért felelős (10). A Fe^{2+} a transzportot követően Fe^{3+} formává oxidálódik a hephaestin által mielőtt a plazmába kerülne. Ott gyorsan hozzákötődik a transferrinhez, amely egy hepatocyták által termelt monomer glycoprotein (1. ábra). Két vas atomot képes megkötni és rendkívül fontos szerepet játszik abban, hogy a vas eljusson az összes szervhez, beleértve a felhasználási

területeket (csontvelő) és a raktározó szerveket (máj) (8). A vas főleg a májban, lépben, csontvelőben és a reticuloendothelialis sejtekben raktározódik ferritin formájában. A ferritin egy olyan összetett fehérje, amely vasból és apoferritin fehérjéből tevődik össze. Ha nem áll rendelkezésre elegendő apoferritin a szervezet számára, hemosziderin formájában is raktározódhat. A vaskörforgás révén a vasat újra fel tudja használni a szervezet, ami azért fontos, mert a felszívódás csak kismértékű vasvesztést tudna fedezni. A szervezetben a vaskiválasztódás mértéke korlátozott, főként a leváló bélhámsejtekkel történik, ami a benne levő vassal együtt a bélsárral ürül (11).

1. ábra: VASFELSZÍVÓDÁS AZ ENTEROCYTÁN KERESZTÜL



Forrás: saját szerkesztés (2018)

3.3. A hepcidin tulajdonságai

3.3.1. A hepcidin formái és szerkezete

A hepcidin humán vizeletből történt első izolálásakor egy cisztinben gazdag kation peptidet írtak le. Két predomináns formája a hepcidin 20 és a hepcidin 25, amelyek 20 illetve 25 aminosavat tartalmaznak. A fehérjében lévő 8 cisztin diszulfid hidakkal kapcsolódik össze (2. ábra). A máj a fő helyszíne annak az mRNS expresszióknak, amely a 84 aminosav tartalmú prepropeptidet kódolja. Azonban a vizeletben csak a 20-25 aminosav forma található meg, valamint kisebb mértékben a hepcidin 22 aminosavas változata is (2). A hepcidin struktúrájában található két β -redőt egy hajtókanyar kapcsol össze. A két antiparalell szál között diszulfid hidak és hidrogénkötés stabilizálja a szerkezetet. Ez a struktúra amfipatikus tulajdonságot kölcsönöz a fehérjének, ami számos antibakteriális és antifungális fehérjére jellemző (12).

2. ábra: A hepcidin aminosav szekvenciája és feltételezhető diszulfid kötések a cisztinek között (1-4, 2-8, 3-7, 5-6)



Forrás: Park és mtsai, 2001 (2)

3.3.2. A hepcidin termelődése és szerepe

A hepcidin fő termelődési helye a máj. A 64 aminosav tartalmú prohepcidint termelő sejtek főleg a portális vénák körül helyezkednek el. A propeptid a májsejtek basolateralis oldalán gyűlik össze. A prohepcidinből a furin-szerű proprotein konvertázok hasítására keletkezhet hepcidin. A prohepcidin és a hepcidin is a hepatocyták basolateralis oldalán ürül a májszinuszoidokba (11).

A hepcidin termelődését a vasháztartás, az oxigén és a gyulladásoos kórképek is befolyásolják. Egerekben vizsgálták például, hogy vastúlterhelés hatására a májban fokozódik az mRNS expresszió (4, 5). Amikor a vas raktározása megfelelő vagy magas szintű, a máj hepcidint termel, amely a vékonybélbe áramlik. Ott a hepcidin a ferroportin

internalizációja által gátolja azt az egyetlen utat, amin keresztül a vas az enterocytákból a plazmába kerül. Ha a vasraktárak szintje alacsony, a hepcidin termelésének csökkentése után a vas a ferroportin segítségével a basolateralis membránon keresztül felszívódhat. Ha az oxigén szállítása nem megfelelő, a szervezet célja több vörösvérsejt képzése. Ennek elérése érdekében csökkenti a hepcidin mennyiségét, így a gátló hatás is csökken, tehát több vas válik elérhetővé a táplálékból és a makrofág illetve hepatocytá raktárakból (13).

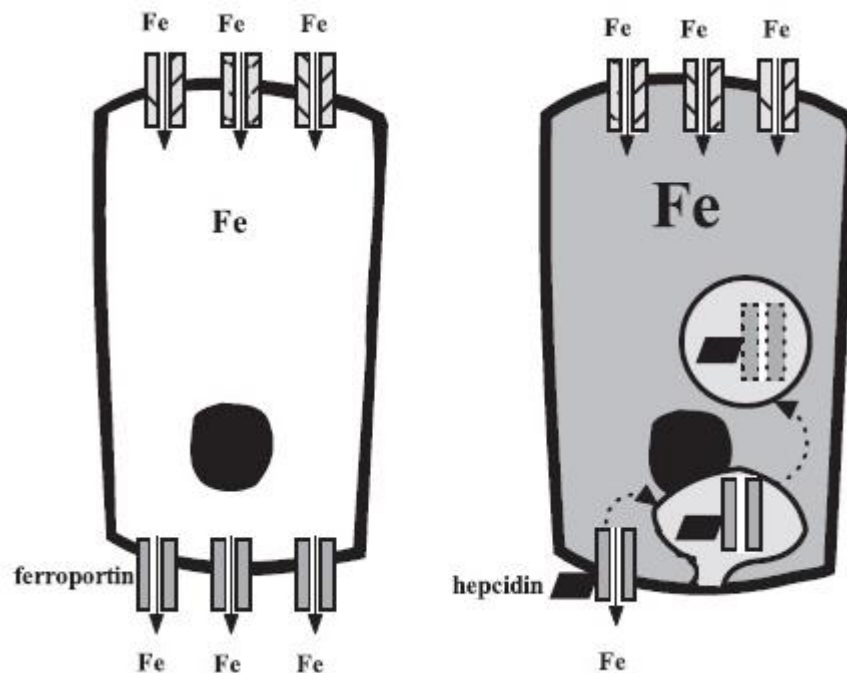
A humán hepcidin antimikrobiális tulajdonságát a felfedezésével egy időben írták le először (2, 3). Nemeth és mtsai (2003) hasonlították össze gyulladás okozta anaemiás és vas hiány okozta anaemia, valamint kontrollált örökölt hemochromatosisos betegek vizeletének hepcidin tartalmát. A gyulladásos anaemiás betegeknél - a többi anaemiás beteggel összehasonlítva - emelkedett vizelet hepcidin tartalmat mértek. Azoknál a betegeknél, akiknél transzfúzió által vas túladagolást idéztek elő, szintén jelentősen emelkedett vizelet hepcidin tartalom volt jellemző (14). Humán primer hepatocytákat vizsgálva kiderült, hogy a hepcidin mRNS kismértékben emelkedett lipopoliszacharid (LPS) kezelés után és nagymértékben emelkedett az LPS kezelésnek kitett monocitákból származó monokinek hatására. A citokinek közül az IL-6 (interleukin-6) nagymértékben indukálta a hepcidin mRNS termelődését. A fertőzések és különösen a patogén specifikus molekulák (pl. az LPS) a makrofágokon hatva - beleértve a máj Kupffer sejtjeit is - az IL-6 termelését eredményezik. Ezek a citokinek pedig a hepatocyták hepcidin mRNS szintézisét indukálják. Következésképp a hepcidin egy II. típusú akut-fázisú fehérje, amely egy molekuláris kapcsolatot biztosít a gyulladás, a létrejövő anaemia és a vas metabolizáció szabályozása között (14, 15).

Összefoglalva megállapítható, hogy a gyulladás által kiváltott emelkedett hepcidin szint és a következményes vashiány miatt elnyomott erythropoesis arra utalnak, hogy a hepcidin kulcsszerepet játszik a gyulladásos anaemiák kialakulásában (15).

A hepcidin azáltal kontrollálja a plazma vasszintjét, hogy szabályozza a bélben a vas felszívódását, a makrofágokból az újrahasznosított hemoglobin vas exportját és a májsejtekben tárolt vas felszabadulását (16). A hepcidin közvetlenül kapcsolódik a ferroportinhoz, amelynek következtében az internalizálódik és a lizoszómák által lebontásra kerül (3. ábra). A ferroportin ezáltal eltűnik a sejtmembránról és megszűnik a celluláris vas export. Ferroportin csatornák leginkább a bélhámsejtek basolateralis membránján, a szöveti makrofágokban és a placenta throphoblast sejtjeiben található. A

bélhámsejteken lévő ferroportin működésének gátlásával a vas az enterocytákkal leválik és kiürül a szervezetből. A hepcidin-ferroportin interakció a makrofágokban is hasonló, tehát hepcidin jelenlétében a vas csapdába esik ezekben a sejtekben (13, 17).

3. ábra: A vas plazmába kerülésének szabályozása a hepcidin-ferroportin interakciót követően az enterocyták basolateralis oldalán



Forrás: Ganz és Nemeth, 2006 (13)

3.3.3. A hepcidin klinikai vonatkozása

Jól ismert a hepcidin szerepe a gyulladásos kórképek által kiváltott nemregeneratív anaemia kialakulásában. Ennek oka, hogy a mikroorganizmusok nagy mennyiségben igénylik a szervezet vastartalmát, így a szervezet igyekszik elzárni azt előlük. Heveny vagy idült gyulladásos betegeknél a hepcidin produkció emelkedésével csökken a szervezetben felhasználható vas mennyisége. A folyamat következménye, hogy a csökkent szérumszint miatt a csontvelő vörösvérsejt képzése is csökken, tehát nemregeneratív anaemia alakul ki, amelyet krónikus vagy gyulladásos betegségek által kiváltott anaemiaként is említenek (17).

3.4. A humán hepcidin kutatások

A hepcidin meghatározása először vizeletből történt kation cserélő kromatográfia, RP-HPLC és CD spektroszkópia, majd vérből MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) tömegspektrometria használatával (2, 3). Az évek során több kísérlet is indult a hepcidin mennyiségi meghatározására. Humán vérszérumból Western blot, szérumból és vizeletből pedig SELDI-TOF (surface-enhanced laser desorption ionization - time of flight) módszerrel mérték a fehérje mennyiségét. Utóbbi módszerrel a hepcidin mind a három formájának (hepcidin-20, -22, -25) kimutatása és szemikvantitatív mennyiségi meghatározása is lehetséges. Ezen kívül a szérum hepcidin koncentráció kvantitatív mérését folyadékkromatográfiás rendszerhez kapcsolt tandem tömegspektrométerrel (LC/MS) végezték. A hepcidin fajok közötti konzervativizmusa, kis mérete és összetett szerkezete miatt mennyiségi meghatározása nehézkes (11). Balogh és mtsai (2009) a vizelet tisztítására és a vizelet hepcidin tartalmának koncentrációja alkalmas, gyors és egyszerű módszert dolgoztak ki. Emellett egy olyan MALDI-TOF szemikvantitatív módszert, amelyben az általuk szintetizált Ac-1-25 peptidszarmazékot, mint hepcidin-szerű belső standard peptidszarmazékot alkalmazták a vizelet hepcidin szintjének mennyiségi meghatározására (11). A hepcidin mérése során figyelni kell a minták megfelelő tárolására, mert a hepcidin-25 mennyisége 1-2 nap alatt csökkenni kezd szobahőmérsékleten. Ennek elkerülésére az azonnal fel nem használt mintákat hűteni szükséges. 4°C-on 1 hétig, -20°C-on 4 hétig, és -80°C körülbelül 2 évig stabil marad a mintában, bár az utóbbi hűtési technika esetében is érdemes 6 hónapon belül felhasználni (18, 19).

Ganz és mtsai (2008) fejlesztették ki az első szérum ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszert a hepcidin mérésére. 65 egészséges férfit vizsgálva a hepcidin koncentráció 29 és 254 ng/ml között változott, míg a kísérletben részt vevő 49 nő szérum hepcidin koncentrációja 17 és 286 ng/ml közötti értéket mutatott. A hepcidin koncentráció 24 egészséges mintában jól korrelált a vizelet hepcidin tartalmával, a szérum hepcidin szint pedig a szérum ferritinnel. Vashiányos anaemiában, vasszegény HFE hemochromatosisban és fiatalkori hemochromatosisban szenvedő betegeknél a szérum hepcidin koncentráció mérhetetlen mennyiségű vagy alacsony szintű volt. A szérum hepcidin koncentrációt magasabbnak találták azoknál a betegeknél, akiknél gyulladáso megbetegedést (C-reaktív protein > 10 mg/dl), multiple myelomát, vagy krónikus

vesebetegséget állapítottak meg (18). A kutatási eredmények alátámasztják azt a feltételezést, mely szerint az előbbieken felsorolt betegségek hatására növekszik a hepcidin koncentrációja. Az állatorvoslás területén napjainkban zajló hepcidinnel kapcsolatos kutatások nagymértékben támaszkodnak a fenti humán orvoslásban elért eredményekre. Cél az, hogy megfelelő diagnosztikai módszerek kerüljenek kidolgozásra a különböző anaemiás kórképek elkülönítésére.

Az extracelluláris vas homeosztázisnak fő szabályozó mechanizmusa a hepcidin-ferroportin kapcsolat, így különböző agonisták és antagonisták alkalmazásával egy újszerű terápiás stratégia fejleszhető ki. A hepcidin agonisták olyan vegyületek, amelyek a hepcidinhez hasonló aktivitásúak, vagy emelik a hepcidin molekula termelését azáltal, hogy a hepcidin-szabályozó molekulákra hatnak. Így ezen a területen folyamatosan fejlesztik a hepcidin szabályozásában résztvevő kis molekulájú modulátorok szerepét, antitesteket hoznak létre, vagy szupra-aktív mini-hepcidineket használnak. Az antagonisták három úton tudják megelőzni a hepcidin okozta ferroportin internalizációt. Megakadályozhatják az interakciót a hepcidin és a ferroportin között, gátolhatják a hepcidin indukálta ferroportin ubiquitinációt vagy az endocytosis folyamatát a ferroportin internalizációjakor. Az agonisták alkalmazásának jelentősége az, hogy megelőzhetőek legyenek a vasfelhalmozódás okozta irreverzibilis elváltozások a szervezetben. Az antagonisták esetleg szerepet játszhatnak azon betegek terápiájában, akik anaemiában vagy krónikus gyulladásban szenvednek (20).

3.5. A hepcidin vizsgálata kutyákban

3.5.1. Szekvenciája és referencia értéktartománya

Fry és mtsai (2004) célja az volt, hogy először klónozzák és szekvenálják a kutya hepcidin génjét és az előzetes adatok összegyűjtésével összefoglalják a hepcidin expresszióját a különböző szövetekben. Az RNS-t friss kutya májszövetből vonták ki, a cDNS-t előállították és amplifikálták. Ezután standard reverz transzkripció polimeráz láncreakció technikát alkalmaztak, majd összehasonlították az aminosav sorrendet más fajok ismert aminosav sorrendjével. A szövetek kutya hepcidin expresszióját Western blottal határozták meg. A 85 aminosav tartalmú fehérje, amelyet klónozott kutya hepcidin cDNS-ből vezettek le, valószínűleg a precursor formája egy kisebb szekretált fehérjének (4. ábra). A kutyában meghatározott fehérje nagy hasonlóságot mutat a 84 aminosav tartalmú humán

hepcidin precursor formával. A hepcidinben meghatározott 4 láncon belüli diszulfid híd a 8-cisztin között konzerválódott a többi fajban is. A kutatás során végzett filogenetikai vizsgálat alapján azonban kijelenthető, hogy az emberi hepcidin sokkal nagyobb hasonlóságot mutat a kutya hepcidinnel, mint a rágcsálókéval. A Western blot által kimutatott körülbelül 9 kDa-os fehérje leginkább a kutya májában, kisebb mértékben a tüdőben és a vesében jelent meg. Ez konzisztens volt a prohepcidin előre kiszámított tömegével és a humán májban talált körülbelül 9 kDa-os fehérjével (21).

4. ábra: Nukleotid (felső sor) és az abból levezetett aminosav (alsó sor) szekvencia a kutya hepcidinben

```

1  ATGGCACTCAGCTCGCAGACCCAGGCTGCCTGCCTCCTGCTCCTCCTCCTGGCCAGCGTG
   M A L S S Q T Q A A C L L L L L L A S V
61  GCCAGTGTCTCAGTCCTTCCACACCAGACAGGACAGCTCACAGACCTCCGAGCCCAGGAC
   A S V S V L P H Q T G Q L T D L R A Q D
121 ACAGCTGGAGCCGAGGCAGGCTGCAGCCCACGCTCCAGCTCCGGAGGCTAAGGAGGCCGA
   T A G A E A G L Q P T L Q L R R L R R R
181 GACACCCACTTCCCCATCTGCATATTCTGCTGTGGCTGCTGTAAACACCGAAGTGTGGG
   D T H F P I C I F C C G C C K T P K C G
241 CTCTGCTGCATAACATAG
   L C C I T *

```

Forrás: Fry és mtsai, 2004 (21)

2016-ban az Állatorvostudományi Egyetemen két párhuzamos kutatásban vizsgálták ELISA kittel egészséges és beteg kutyák szérum hepcidin szintjét. A szakdolgozat célja az egészséges kutyákra vonatkozó referenciaérték meghatározása, valamint egy gyors és pontos módszer kidolgozása volt. Az eredmények alapján a hepcidin átlag koncentrációja 1,23 ng/mL volt, a hepcidin normál értékét pedig 0,3 - 2,8 ng/ml közé sorolták. A teljes vaskötő kapacitás (TVK) és a hepcidin koncentráció között szignifikáns összefüggést találtak (22). A C-reaktív protein (CRP) és a hepcidin egészséges kutyákban szintén korrelált. Azonban a minták egy részének újbóli mérése során a mintán belüli szórás túl magas volt, illetve a társ kutatásban végzett beteg kutyák hepcidin szintje nem tért el szignifikánsan az egészségesekétől, ahogy azt a korábbi kutatások eredményei alapján várták. Az eredmények alapján az ELISA mérés pontossága kétségbe vonható és így a kapott referenciatartomány értéke is (22).

3.5.2. A humán kutatások eredményeinek hatása az állatorvostudományra

A párhuzamosan készült TDK dolgozatban megpróbálták felderíteni, hogy a kutyák esetében is igaz-e a humán orvoslásban kutatott feltételezés, mely szerint különböző gyulladási kórképek által kiváltott nemregeneratív anaemiával járó betegségek hátterében emelkedett hepcidin szint állhat. A beteg csoportba sorolt kutyák hematokrit, alanin-aminotranszferáz (ALT), karbamid, kreatinin és TVK értékei szignifikánsan eltértek az egészséges kontroll csoportéhoz képest. ELISA módszerrel az átlagos szérumban hepcidin koncentrációt meghatározva azonban nem volt szignifikáns különbség a beteg és a kontroll csoport között. A beteg csoport hepcidin- és CRP-értékei között pozitív volt a korreláció, míg a hepcidin- és vaskoncentrációk között nem találtak összefüggést. Az fentebb leírt okok miatt az ELISA módszer pontatlannak bizonyult, de emellett a csoport heterogén összetétele is hozzájárulhatott ahhoz, hogy a hipotézist nem sikerült alátámasztani (23). Következtetésük alapján további vizsgálatok szükségesek a humán orvoslásban elért eredmények állatorvoslásban történő hasznosíthatóságához.

3.5.3. Az egészséges kutyák kiszűrése a vizsgálathoz

A gyulladási betegségek általában AID (anaemia of inflammatory disease) kialakulásához vezetnek számos mechanizmuson keresztül, beleértve a vas homeosztázis változását, a megváltozott erythroid progenitor sejtek proliferációját, az erythropoietin termelését és a vörösvérsejtek élettartamának csökkenését. Az immunstimulációkor termelődő citokinek a máj akut fázisú fehérjéinek - mint a CRP vagy hepcidin - termelődését eredményezik. A hemoglobin függő reticulocyták szintén erősen megváltozhatnak gyulladási állapotban. A gyulladási betegségekben szenvedő pácienseknél a normálistól eltérő rMCV (mean reticulocyte volume), reticulocyták RDW (reticulocyte distribution width), microcyter reticulocyták %, macrocyter reticulocyták %, CHr (reticulocyták haemoglobin content) és magas vagy alacsony CHr tartalmú reticulocyták % értékeket mérhetünk. Az anaemiás kutyákban magasabb a plazma CRP, ferritin, reticulocyták és WBC (white blood cell) koncentráció, mint a nem anaemiás és egészséges állatokban (24). A kutatásunkhoz alkalmas, egészséges kutyák kiszűréséhez elsősorban a fent említett, de egyéb paramétereket is ellenőriznünk kellett a megelőző vérkép értékelése során.

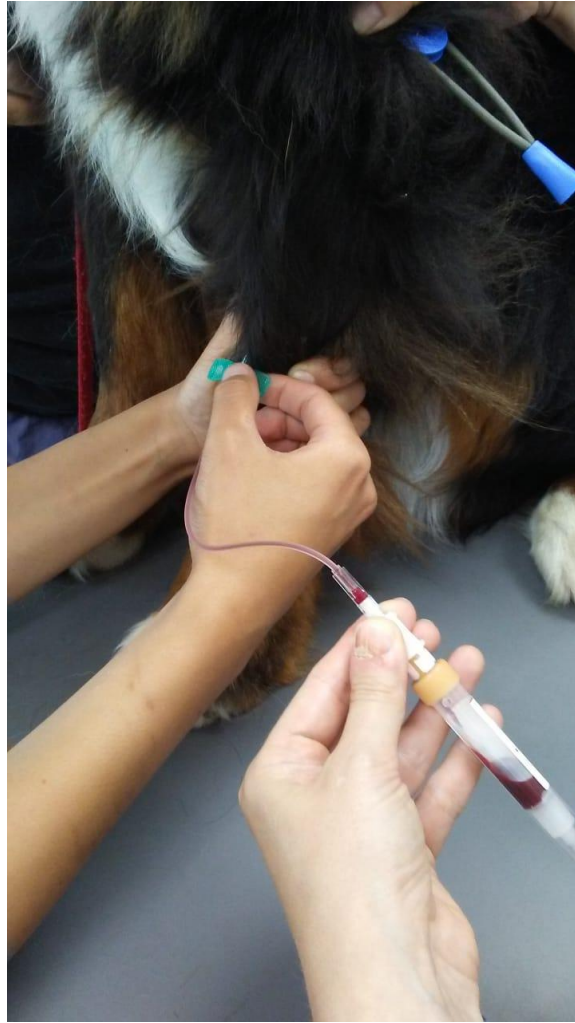
4. CÉLKITŰZÉSEK

A kutatásunk célja egészséges kutyákban a hepcidin referencia értéktartományának meghatározása. Elsősorban egy olyan mérési módszert kellett kidolgoznunk, amely LC/MS segítségével képes kimutatni a hepcidint és mérni annak mennyiségét. A hepcidin mérése jelentős szereppel bír a jövőben a különböző anaemiás kórképek esetén a pontosabb és gyorsabb diagnózis felállításában.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. A mintavétel menete és a laboratóriumi vizsgálat

2017 és 2018 között az Állatorvostudományi Egyetem Belgyógyászati Tanszékének klinikáján és a debreceni Főnix Állatorvosi rendelőben került sor a vérminták levételére. Az egészséges kutyáknak előzetesen több szempontnak meg kellett felelniük, mielőtt elvégeztük a vizsgálat további részét. A vizsgálatban csak 1 és 8 év közötti kutyák vehettek részt, akik a mintavétel időpontjához képest két héten belül semmilyen védőoltást nem kaptak, nem álltak kezelés alatt, nem tüzeltek és akiknél a tulajdonosok a megszokottól eltérő viselkedést nem tapasztaltak. A vizsgálat megkezdése előtt a tulajdonos elmondásai alapján feljegyeztünk néhány információt a kutya általános állapotáról, így az étvágyáról, vízfogyasztásáról, hányásról, bélsaráról, vizelet mennyiségéről és minőségéről valamint az esetleg szedett gyógyszerekről. Ezen kívül fontos volt számunkra az utolsó oltások dátuma, a pontos kor és testtömeg valamint, járt-e a kutya külföldön egy éven belül. A tulajdonosok írásos beleegyezéssel járultak hozzá a kutyák vizsgálatához, a mintavételhez és a kapott adatok felhasználásához. A fizikális vizsgálat során felvettük az állat klinikai alapértékeit, majd az egyes szervrendszerek vizsgálatát követően került sor a vérvételre. A vérvétel a terület fertőtlenítése után a v. cephalica antebrahiiból, a v. saphena lateralisból vagy a v. jugularis externából történt szérum-szeparátoros és alvadásban gátolt (K-EDTA) csövekbe (1. kép). Ezt követően a vizsgálat részeként a kutyáktól spontán ürített vizeletet gyűjtöttünk. Összesen 114 kutyától történt vérvétel két év alatt.



1. kép: Vérvétel a v. cephalica antebrachiiából
Forrás: saját fotó (2018)

A vér diagnosztikai vizsgálataira a PraxisLab Kft. laboratóriumában (1038 Budapest, Vasút sor u. 34.) került sor. A teljes hematológiai vizsgálathoz Siemens Advia 120 típusú gépet használtak. Első lépésben a szérum szeparátoros csöveket 4000G-n 5 percig centrifugálták (2. kép). A hematológiai vizsgálat során mért fontosabb paraméterek: vörösvérsejtszám, hemoglobinn, hematokrit, MCV (átl. vvs térfogat), MCH (átl. vvs Hb-tartalom), MCHC (átl. vvs Hb koncentráció), thrombocytaszám, fehérvérsejtszám, reticulocytaszám, szegment %, Band (Stab) %, Lymphocytaszám, Monocytaszám, Eosinophil %, Basophil %. A vérkenet (Olympus bx45) morfológiai vizsgálatokor a kutyák Babesia canisra és Microfilaria is szűrve lettek. A biokémiai vizsgálatok során Beckman coulter AU480 típusú gépet használtak. A vizsgált biokémiai labor paraméterek: összfehérje, albumin, alanin-aminotranszferáz, összbilirubin, karbamid, kreatinin, nátrium, kálium, Na/K arány, klorid, vas, látens vaskötő kapacitás, teljes vaskötő kapacitás, CRP. A

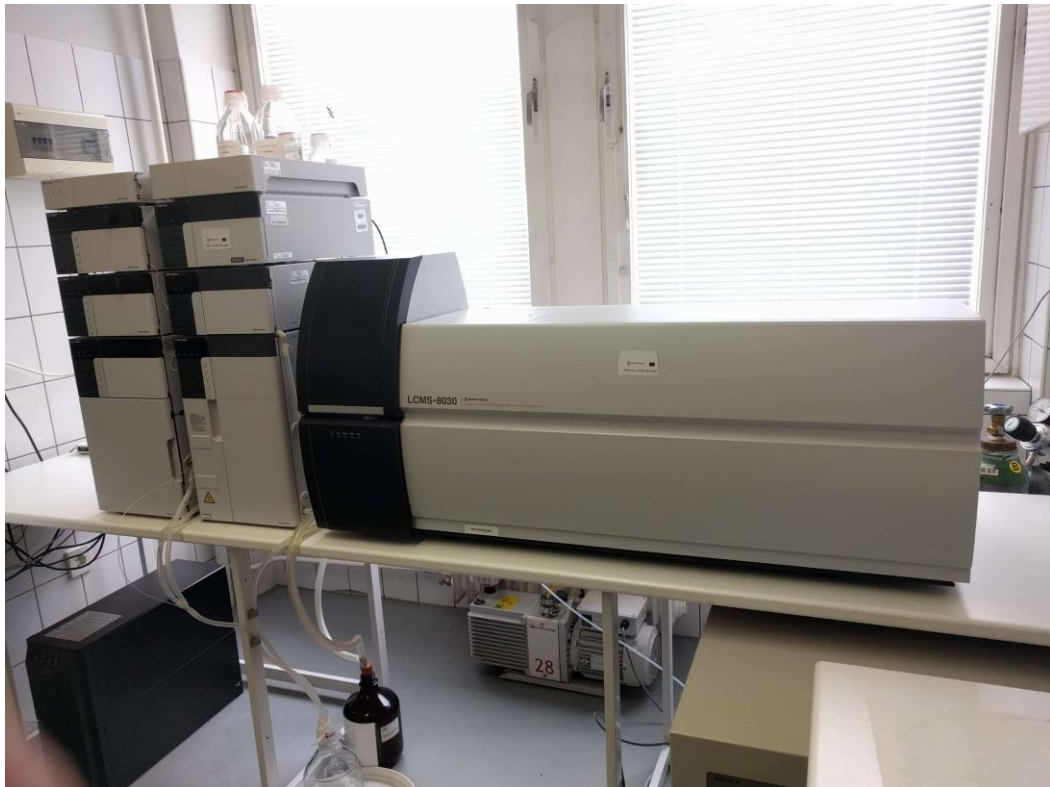
spontán gyűjtött vizelet alap fizikai-kémiai elemzése (szín, átlátszóság, sűrűség, pH, fehérje, hemoglobin, glükóz, keton, nitrit, bilirubin, urobilinogén) mellett sor került a vizeletüledék (vörösvérsejt, fehérvérsejt, hámsejt, kristály, cilinder) és speciális vizeletvizsgálatokra is (összefehérje ultraszenzitív, vizelet kreatinin, fehérje-kreatinin arány, microalbumin, vizelet nátrium, frakcionált Na ürítés). A kapott eredmények alapján választottuk ki azokat az egészséges kutyákat, amelyeknél releváns eltérést nem találtunk a laboreredményekben, így szérum mintáit felhasználtuk a hepcidin mennyiségi meghatározására is. A szérumot a későbbi felhasználásig – 80 °C-on tároltuk.



2. kép: Vérminták centrifugálása
Forrás: saját fotó (2018)

5.2. A hepcidin mennyiségi mérése LC/MS módszerrel

A szérumban hepcidin mennyiségi mérésének módszerét az Élelmiszerhigiéniai Tanszék munkatársaival dolgoztuk ki. Az LC/MS mérések a tanszéken található Shimadzu LCMS 8030 LC-MS/MS készülékkel történtek kombinálva electrospray ionisation (ESI) ionforrással (3. kép). A detektált ion: hepcidin 3+ (azaz, a fehérje háromszorosan protonált verziója). A mintaelőkészítéshez 600 µl vérszérumot használtunk. 300 µl 0,1% hangyasavat tartalmazó vizet adtunk hozzá, vortexeléssel homogenizáltuk, majd további 500 µl víz hozzáadása következett. Minden hozzáadott oldatot előzetesen jégben hűtöttük. Az így meghígított vérszérum került a szilárdfázisú extrakciós oszlopra (Phenomenex C18), majd a nemkívánatos komponensek eltávolítása után a hepcidint 3x250 µl 0,1% hangyasavat tartalmazó metanollal oldottuk le. Az oldatokat szárazra pároltuk 39 °C-on, nitrogén áramban (körülbelül 40 perc), majd 300 µl acetonitril/víz/trifluor-ecetsav 33,8/66,2/0,1 (v/v/v) elegyben oldottuk vissza. A visszaoldott mintát 4 °C-on, 8000 rpm fordulattal, 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszó került a kromatográfiás vialba és az LC-MS/MS elemzésre. A mérésekhez a Peptides International (Kentucky, USA) cégtől rendelt kutya hepcidin standardet használtunk, a negatív kontroll szarvasmarha szérumban volt. Azért választottuk a szarvasmarha szérumot vakpróbának, mert a hepcidin 25 aminosav sorrendje 6 aminosavban tér el a kutyaétól (29). Egy kutya szérumban mintájából három párhuzamos mérés készült, amelynek átlaga került a statisztikai vizsgálatba, amennyiben a relatív szórás nem volt nagyobb, mint 15 %. Az ennél nagyobb eltérést mutató értékeket nem számítottuk bele az átlagba.



3. kép: LC/MS készülék
Forrás: saját fotó (2018)

5.3. Statisztikai analízis

A vérvételen részt vevő kutyák adatait a Microsoft Office Excel 2010 programban foglaltuk össze. A statisztikai elemzésekhez, így a korrelációk és szignifikancia ($p < 0,05$) vizsgálatához az R statisztikai program Mann-Whitney-Wilcoxon próbáját és Spearman féle korrelációs tesztet használtuk. A hepcidin referencia értéktartományát a MedCalc statisztikai programmal számítottuk ki. A hepcidin mérések pontosságát és megbízhatóságát az Intra-Assay variációs koefficiens képlete alapján ($CV = \text{Standard Deviation} / \text{Mean} * 100$) a mintánkénti három mérés átlagából és szórásából ellenőriztük (Net1).

6. EREDMÉNYEK

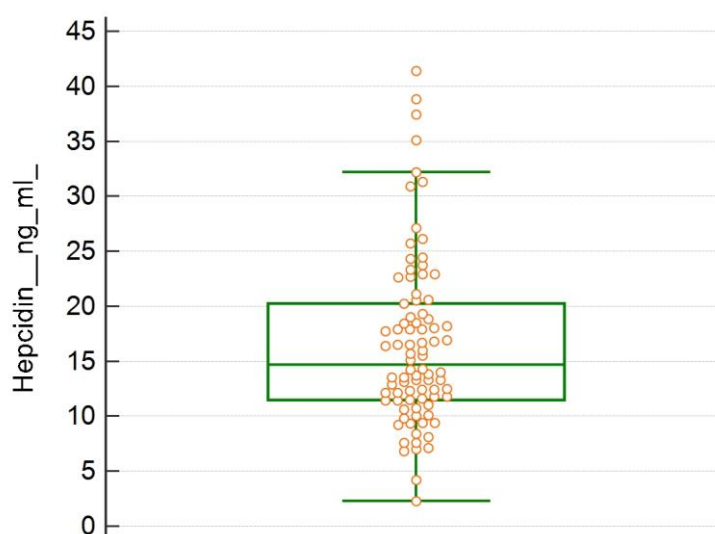
6.1. A vizsgált minták jellemzői

A 114 vérminta vizsgálati eredményei alapján 28 kutyát (25%) ki kellett zárunk a későbbi mérésekből emelkedett fehérvérsejtszám, emelkedett CRP (n=6), Microfilaraemia (n=3) és jelentősen eltérő biokémiai paraméterek miatt. Az LC/MS mérésben részt vett minták száma 86 db (44 szuka és 42 kan) volt. A szukák közül 28, a kanok közül 25 kutya volt ivartalanítva. A vizsgálatra 28 különböző fajtájú kutya érkezett, amelyek közül nagyobb számban képviseltette magát a border collie (n=8), a labrador retriever (n=5), a golden retriever (n=5), a magyar vizsla (n=5) fajta és a keverékek (n=25). Az egészséges populáció átlag életkora 4,4 év, a legfiatalabb kutya 9 hónapos, a legidősebb 9 éves volt.

6.2. A hepcidin referencia értéktartománya és korrelációi

Az LC/MS mérés során kapott eredményekből a hepcidin referencia értéktartományát a MedCalc statisztikai programmal határoztuk meg. A vizsgált mintáink alapján az egészséges kutyák szérum hepcidin referencia értéktartománya 1,4-31,7 ng/ml, szórás +/- 7,7 ng/ml, átlag koncentrációja 16,6 ng/ml (minimum: 2,3 ng/ml; maximum: 41,4 ng/ml; medián: 14,7 ng/ml) volt (5. ábra). Az adatok alapján az Intra-Assay variációs koefficiens CV= 0,665 %.

5. ábra: A hepcidin referencia értéktartományának ábrázolása Box plot grafikonon

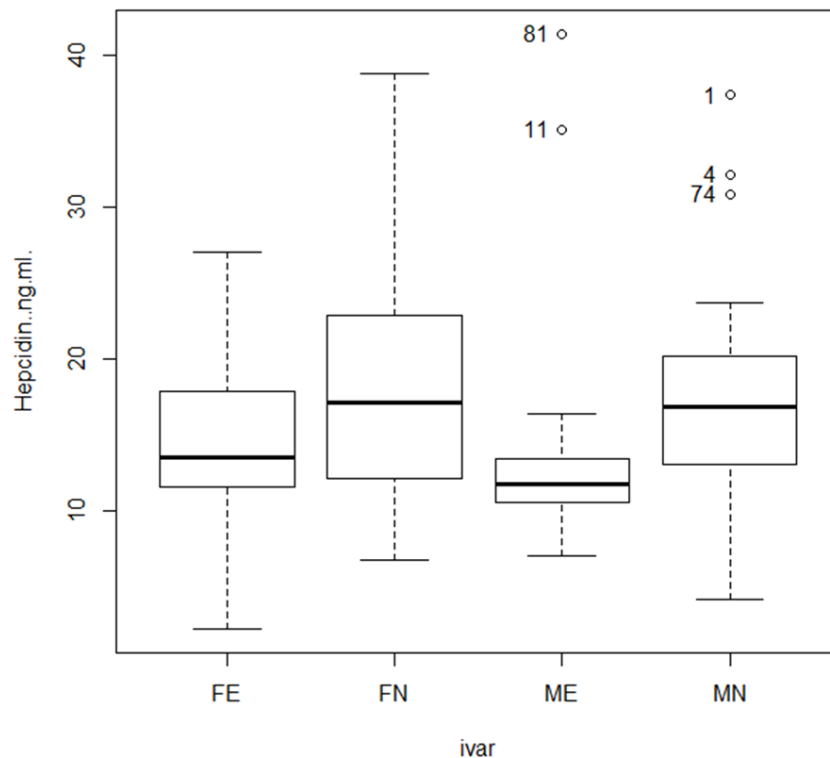


Az R statisztikai programban Mann-Whitney-Wilcoxon próbát használva a kapott hepcidin értékeket összevetettük a nemekkel és azt tapasztaltuk, hogy nincs szignifikáns különbség a hepcidin koncentrációban a kanok és a szukák között (1. táblázat). A hepcidin koncentrációt a nemeken belül ivari státusz szerint is vizsgáltuk (6. ábra).

	Ivaros szuka	Ivartalanított szuka	Ivaros kan	Ivartalanított kan
Ivaros szuka		p= 0.08325	p= 0.3755	p= 0.1754
Ivartalanított szuka	p= 0.08325		p= 0.09837	p= 0.9464
Ivaros kan	p= 0.3755	p= 0.09837		p= 0.2633
Ivartalanított kan	p= 0.1754	p= 0.9464	p= 0.2633	

1. táblázat: Az ivaros és ivartalanított szuka és kan kutyák hepcidin értékeinek összefüggései

6. ábra: A hepcidin koncentráció ivar szerinti ábrázolása Box plot diagrammon



A statisztikai elemzéseink során vizsgáltuk a hepcidin és a laboratóriumi paraméterek közül a vas, a látens vaskötő kapacitás (LVK), a vörösvérsejtszám, a hematokrit valamint a kor közötti összefüggéseket. A Spearman féle korrelációs teszt elvégzése után megállapítottuk, hogy egészséges populáción belül nincs szignifikáns korreláció a hepcidin és a vas ($p= 0.2738$, $\rho -0.1238204$), a látens vaskötő kapacitás ($p= 0.613$, $\rho -0,059$), a vörösvérsejtszám ($p= 0.5536$, $\rho 0.06475217$) és a hematokrit ($p= 0.4265$, $\rho -0.08686442$) értékek között. Elemeztük továbbá a hepcidin és a kutyák kora közötti összefüggést, de szignifikáns korrelációt ebben az esetben sem találtunk ($p= 0.4894$, $\rho -0.07553392$).

7. MEGBESZÉLÉS

Két évig tartó munkánk során a célunk az volt, hogy egy eredményes módszert dolgozzunk ki a kutyák szérum hepcidin szintjének mérésére, és meghatározzuk a hepcidin referencia értéktartományát egészséges egyedekben. A humán szakirodalomban erre a célra használt „gold standardnak” minősülő LC/MS módszert választottuk. Ahhoz, hogy ezt az eljárást a kutyák szérum hepcidin méréséhez használni tudjuk, ki kellett dolgoznunk egy erre megfelelő módszert, amihez kutya standard hepcidin reagenst alkalmaztunk.

A vizsgált 86 egészséges kutya szérum hepcidin referencia értéke 1,4-31,7 ng/ml volt. A humán kutatások során szintén LC/MS módszerrel mért szérum hepcidin referencia értéktartománya 1,5-15,2 nmol/L (25). A humán orvostudományban számottevő különbség van a férfiak és a nők szérum hepcidin koncentrációja között. A nők esetében a menstruáció során jelentkező vérzésnél jelentős mennyiségű vas ürül ki a szervezetből, ezért rájuk átlagosan csökkent szérum hepcidin szint (a nőknél 18-50 év között 0,4-9,2 nmol/l, 50 év felett 0,7-16,8 nmol/l, a férfiaknál 18 év felett 1,1-15,6 nmol/l) jellemző (27). A statisztikai elemzéseink során a kutyák esetében nem találtunk szignifikáns összefüggést a kanok és a szukák eltérő hepcidin koncentrációja között, mivel a szukák tüzelése során nincs jelentős vérvesztés. A humán kutatások során különböző értékeket tapasztaltak nem csak a nemek között, hanem a nemeken belül az egyes korcsoportok között is (27). Az egészséges kutya populációban a kapott eredmények alapján nem tudjuk alátámasztani a kor és a hepcidin koncentráció közötti összefüggést.

A laboratóriumban vizsgált biokémiai paraméterek közül a vas, az LVK, hematológiai paraméterek közül a vörösvérsejtszám és a hematokrit hepcidinnel való kapcsolatát vizsgáltuk. A hepcidin vasháztartásban játszott szerepe miatt összehasonlítottuk a fenti paramétereket a hepcidin koncentrációjával. A szervezetben a vasraktárak kiürülésekor, vagy fokozott vörösvérsejtképzés igény esetén a hepcidin expressziója csökken annak érdekében, hogy a bélhámsejteken keresztül a vas felszívódjon a vérplazmába. Normális vasraktározás, vagy túl magas szérum vaskoncentráció esetén a máj hepcidint termel (13). A felsorolt paraméterek és a szérum hepcidin koncentrációja között azonban nem találtunk szignifikáns összefüggést.

Li és mtsai (2009) írtak le egy teljesen validált LC/MS eljárást a hepcidin mérésére humán szérumban, amely alapjául szolgált az általunk kidolgozott módszernek a kutyák szérum hepcidin szintjének meghatározásához (26). A kapott eredmények alapján bebizonyítottuk,

hogy az LC/MS mérés pontos és megbízható módszer a kutyák szérum hepcidin szintjének vizsgálatára (CV= 0,665).

A kutatásunk során - az állatorvosi szakirodalomban először - egy nagy populáció szérum hepcidin értékei alapján megállapítottuk az egészséges kutyák szérum hepcidin referencia értéktartományát, ezzel egy kontroll csoportot adva a későbbi kutatások számára. Az LC/MS mérési módszer kidolgozásával lehetővé vált a kutyák szérum hepcidin szintjének pontos mérése, így ezt a módszert beteg kutyák hepcidin mérésére is felhasználhatjuk. A beteg kutyák szérum hepcidin koncentrációja összehasonlítható az egészséges egyedekével, ezáltal vizsgálhatóvá válnak a humán szakirodalom által leírt összefüggések, miszerint bizonyos krónikus gyulladákos betegségben szenvedő pácienseknél emelkedett szérum hepcidin szint mérhető (18). További kutatásokat igényel kutyák esetében a hepcidin vizeletből való kimutatása és összevetése a szérum hepcidin értékekkel.

8. ÖSSZEFOGLALÓ

A hepcidin (hepatic antibactericid protein) egy májban termelődő antimikrobiális tulajdonságú fehérje, amely a vasháztartás szabályozásában fontos szerepet játszik. A hepcidin csökkenti a szérumban vaskoncentrációját elsősorban a bélhámsejtek és makrofágok membránjában lévő ferroportin-csatornák vastranszportjának gátlásával. A szervezetet megtámadó mikroorganizmusok elöl elzárja a számukra szükséges vasforrásokat, így segít eliminálni azokat. A szérumban alacsony vaskoncentrációja miatt a vörös csontvelő vörösvérsejtképzése elégtelenné válik és nemregeneratív anaemia jön létre. A humán kutatások igazolták, hogy a heveny és idült gyulladásos betegeknél a szérumban hepcidin szint megemelkedik, ezáltal szerepet játszva a krónikus vagy gyulladásos kórképek által kiváltott nemregeneratív anaemia kialakulásában.

Jelen kutatásunk célja, hogy az egészséges kutyák szérumban hepcidin koncentrációját a humán gyakorlatban „gold standardnak” minősülő, folyadék kromatográfiás – tömeg spektrometriás (LC/MS) módszerrel vizsgáljuk. Ennek eredményeképpen a későbbiekben az egészséges kutyák hepcidin szintjéhez tudjuk viszonyítani a beteg kutyák szérumban hepcidin koncentrációját. A kutatásba 114 kutyát vontunk be. A teljesen egészséges egyedek kiválasztásánál fizikális és laboratóriumi vizsgálatok (hematológiai és biokémia paraméterek, vérkenet morfológia, rutin vizeletvizsgálat) eredményeit vettük figyelembe. Az LC/MS mérésben így 86 kutya szérumban mintáját használtuk fel, amelyek közül 44 szuka és 42 kan volt. A mérés során kutya hepcidin standard reagenst használtunk. Az egészséges kutyák hepcidin referencia értéktartománya 1,4-31,7 ng/ml, átlag koncentrációja 16,6 ng/ml (szórás: +/- 7,7 ng/ml; minimum: 2,3 ng/ml; maximum: 41,4 ng/ml; medián: 14,7 ng/ml) volt.

Kutatásunk során az állatorvosi gyakorlatban elsőként dolgoztuk ki a kutya hepcidin mérésére szolgáló LC/MS módszert, amelynek segítségével egy nagy esetszámú populációban meghatároztuk az egészséges kutyák referencia értéktartományát. A szérumban hepcidin szint meghatározása ezzel az eljárással egy pontos diagnosztikai módszer lehet a különböző eredetű nemregeneratív anaemiák elkülönítésében.

9. SUMMARY

The hepcidin (hepatic antibactericid protein) is a protein with antibacterial characteristics produced in the liver; it has an important role in the regulation of the iron homeostasis. The hepcidin decreases the iron concentration of the blood serum primarily with inhibiting the ferroportin-channels in the membrane of the enterocytes and macrophages. It helps to eliminate the body offending microorganisms by cutting off their required iron sources. The erythrocyte production in the red bone marrow decreases because of the low iron concentration of the serum which causes a non-regenerative anaemia. Human experiments confirmed that in patients with acute and chronic inflammatory diseases the hepcidin level is increased, therefore it plays a role in the formation of the chronic or inflammatory disease caused non-regenerative anaemia.

The purpose of this research is to detect serum hepcidin in healthy dogs with a liquid chromatography - mass spectrometry (LC/MS) method which is a 'gold standard' process according to human practice. Therefore we can compare the serum hepcidin level of healthy dogs to diseased patients in the future. We included 114 dogs in the research. Dogs were considered as healthy based on physical and laboratory examination (haematology, biochemical parameters, blood smear morphology, routine urine examination) results. Serum samples of 86 dogs (44 females and 42 males) were available for the LC/MS measurement. During the assays standard canine hepcidin reagent was used. The reference range of hepcidin in this healthy dog population was 1,4-31,7 ng/ml, average concentration was 16,6 ng/ml (standard deviation: +/- 7,7 ng/ml; minimum: 2,3 ng/ml; maximum: 41,4 ng/ml; median: 14,7 ng/ml).

During our research, the first time in the veterinary practice we developed the LC/MS method for measuring the canine serum hepcidin level and defined the reference range in large population of healthy dogs. With this analysis, detection of the serum hepcidin level can be an accurate method in the future to help to diagnose anaemia of chronic disease in patient presented with non-regenerative anaemia.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ganz, T., 2011: Heparin and iron regulation, ten years later. *Blood*, 117(17). 4425-4433.
2. Park, H. C., Valore, V. E., Waring, J. A., Ganz, T., 2000: Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11). 7806–7810.
3. Krause, A., Neitz, S., Mägert H-J., Schulz, A., Forssmann, W-G., Schulz-Knappe, P., Adermann, K., 2000: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters*, 2-3. 147-150.
4. Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., Loréal, O., 2000: A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide heparin, is overexpressed during iron overload. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11). 7811-7819.
5. Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., Vaulont, S., 2001: Lack of heparin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(15). 8780–8785.
6. Gulec, S., Anderson, J. G., Collins, F. J., 2014: Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 307(4). 397-409.
7. Frazer, M. D., Wilkins, J. S., Becker, M. E., Vulpe, D. C., Mckie, T. A., Tindler, D., Anderson, J. G., 2002: Heparin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology*, 123(3). 835–844.
8. Daher, R., Manceau, H., Karim, Z., 2017: Iron metabolism and the role of the iron-regulating hormone heparin in health and disease. *La Presse Médicale*, 46. 272-278.
9. McKie, T. A., 2008: The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochemical Society Transactions*, 36(6). 1239-1241.
10. Fuqua, K. B., Vulpe, D. C., Anderson, J. G., 2012: Intestinal iron absorption. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2-3). 115-119.
11. Balogh, Á., 2009: A vasháztartást szabályzó heparin kimutatása és szerepe a perinatális vasháztartásban. Doktori értekezés. Budapest, Semmelweis Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola.
URL: http://phd.semmelweis.hu/mwp/phd_live/vedes/export/baloghadam.d.pdf
Megtekintve: 2018. 01. 15.
12. Hunter, N. H., Fulton, B. D., Ganz, T., Vogel, J. H., 2002: The solution structure of human heparin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(40). 37597- 37603.
13. Ganz, T., Nemeth, E., 2006. Iron imports. IV. Heparin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(2). 199-203.
14. Nemeth, E., Valore, V. E., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., Ganz, T., 2003: Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 101(7). 2461-2463.

15. Ganz, T., 2003: Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 102(3). 783-788.
16. Nemeth, E., Tuttle, S. M., Powelson, J., Vaughn, B. M., Donovan, A., Ward, M. D., Ganz, T., Kaplan, J., 2004: Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306(5704). 2090-2093.
17. Vizi, Zs., Aradi, Zs., Sterczler, Á., 2014: A heparin szerepe a vasanyagcsere szabályozásában. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 136. 671-675.
18. Ganz, T., Olbina, G., Girelli, D., Nemeth, E., Westerman, M., 2008: Immunoassay for human serum heparin. *Blood*, 112(10). 4292-4297.
19. Girelli, D., Nemeth, E., Swinkels, W. D., 2016: Heparin in the diagnosis of iron disorders. *Blood*, 127(23). 2809-2813.
20. Rochette, L., Gudjoncik, A., Guenancia, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C., 2015: The iron-regulatory hormone heparin: A possible therapeutic target? *Pharmacology & Therapeutics*, 146. 35-52.
21. Fry, M. M., Liggett, L. J., Baek, J. S., 2004: Molecular cloning and expression of canine heparin. *Vet Clin Pathol.*, 33. 223-227.
22. Sebesztha, B., 2016: A kutyák heparin szintjének referencia érték meghatározása ELISA módszerrel. Szakdolgozat. Állatorvostudományi Egyetem Belgyógyászati Tanszék és Klinika
23. Németh, K., 2016: A heparin szerepe kutyák nemregeneratív anaemiájában. TDK dolgozat. Állatorvostudományi Egyetem, Belgyógyászati Tanszék és Klinika
24. Meléndez-Lazo, A., Tvarijonavičiute, A., Cerón, J. J., Planellas, M., Pastor, J., 2015: Evaluation of the relationship between selected reticulocyte parameters and inflammation determined by plasma C-reactive protein in dogs. *J Comp Pathol.*, 152(4). 304-312.
25. Wolff, F., Deleers, M., Melot, C., Gulbis, B., Cotton, F., 2013: Heparin-25: Measurement by LC-MS/MS in serum and urine, reference ranges and urinary fractional excretion. *Clinica Chimica Acta.*, 423. 99-104.
26. Li, H., Rose, J. M., Tran, L., Zhang, J., Miranda, P. L., James, A. C., Sasu, J. B., 2009: Development of a method for the sensitive and quantitative determination of heparin in human serum using LC-MS/MS. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.*, 59. 170-180.
27. Itkonen, O., Parkkinen, J., Stenman, U-H., Hämäläinen, E., 2012: Preanalytical factors and reference intervals for serum heparin LC-MS/MS method. *Clinica Chimica Acta.*, 413. 696-701.
28. Chanu. V. K., Thakuria. D., Kumar, S., 2018: Antimicrobial peptides of buffalo and their role in host defenses. *Veterinary World.*, 11(2). 192-200.

Net1: <https://toptipbio.com/calculate-coefficient-variation-cv/>

Megtekintve: 2018.10.10.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Dr. Vizi Zsuzsannának és Dr. Sterczer Ágnesnek, akik áldozatos munkájukkal, szakmai tudásukkal és gyakorlati tapasztalatukkal hozzájárultak a dolgozatom elkészítéséhez. Türelmükkel, segítőkészségükkel támogattak a kutatás ideje alatt.

Köszönettel tartozom Dr. Lányi Katalinnak és az Élelmiszerhigiéniai Tanszék munkatársainak az LC/MS módszer kidolgozásában és a mérések elvégzésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm a PraxisLab Kft. munkatársainak a laboreredmények elkészítését, amely lehetővé tette számunkra az egészséges kutyák kiválasztását.

Hálás vagyok Dr. Bodó Zsuzsannának és a Főnix Állatorvosi rendelő munkatársainak, hogy lehetővé tették és részvételükkel segítették számunkra a mintagyűjtés.

Szeretném megköszönni Dr. Hunyadi Ágnesnek és Szemző Nórának a segítségüket, támogatásukat.

Köszönöm az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának a támogatását.

Végtelenül hálás vagyok minden gazdának és kutyáiknak a vérvételen történő részvételért, amellyel biztosították a kutatás sikeres elvégzését.

Köszönettel tartozom mindenkinek, aki gondolkodásával, ötleteivel, személyes közreműködésével hozzájárult a kutatásomhoz.

NYILATKOZAT

Alulírott Bagi Melinda nyilatkozom, hogy szakdolgozatom, melynek címe „Egészséges kutyák szérum hepcidin szintjének vizsgálata LC/MS módszerrel” tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2018. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

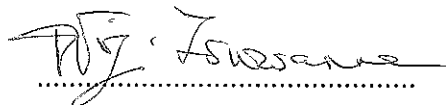
Budapest, 2019. november 7.

...Bagi Melinda

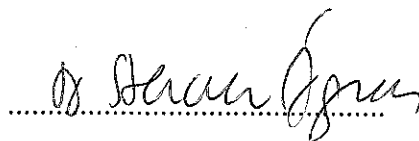
Bagi Melinda
hallgató

Alulírott Dr. Vizi Zsuzsanna, Dr. Sterczer Ágnes igazolom, hogy Bagi Melinda „Egészséges kutyák szérumban hepcidin szintjének vizsgálata LC/MS módszerrel” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. november 08.



Dr. Vizi Zsuzsanna
klinikai állatorvos, osztályvezető
Belgyógyászati Tanszék és Klinika



Dr. Sterczer Ágnes
egyetemi docens
Belgyógyászati Tanszékszék és Klinika

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: BAGI MELINDA
Elérhetőség (e-mail cím): melinda.vizsla@gmail.com
A feltöltendő mű címe: Egyszerűsített kutyák szemüvegpecsétjei sütijelek vizsgálata LC/MS módszerrel
A mű megjelenési adatai: 2019
Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

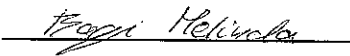


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2013. év .november..hó ...7.:...nap


aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*